



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101659954 B

(45) 授权公告日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200910160070. 2

C12N 15/70(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 07. 22

C12Q 1/68(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/53(2006. 01)

CGMCC No. 2987 2009. 03. 26

A61K 48/00(2006. 01)

A61K 39/02(2006. 01)

(73) 专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

A61P 11/00(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街 427 号

C12Q 1/70(2006. 01)

C12R 1/93(2006. 01)

(72) 发明人 辛九庆 李媛 郭丹 郭军 陈超
曹培丽 张美晶 董惠 姜海芳

C12R 1/19(2006. 01)

C12R 1/35(2006. 01)

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139

审查员 丁海

代理人 孙皓晨 费碧华

(51) Int. Cl.

C12N 15/31(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 7/01(2006. 01)

C07K 14/30(2006. 01)

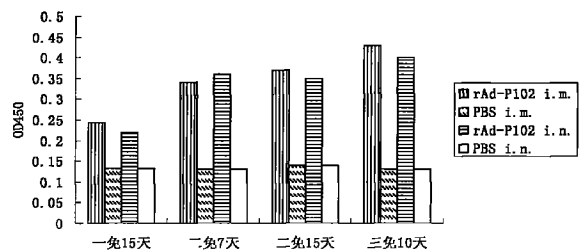
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 3 页

(54) 发明名称

表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用。本发明首先将猪肺炎支原体 P102 蛋白的基因进行突变,将突变后的全基因 (SEQ ID NO :1) 克隆到穿梭载体 pShuttle-CMV 上,得到重组穿梭载体;经线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的感受态细胞中,通过细菌内同源重组获得重组腺病毒。重组腺病毒经间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定证明该重组腺病毒成功表达了 P102 蛋白。将本发明重组腺病毒以肌注和滴鼻两种途径免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,重组病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和胞免疫应答,表明本发明重组腺病毒可应用于猪支原体肺炎的诊断、预防或治疗。



1. 一种重组腺病毒,其特征在于:其微生物保藏号是 CGMCCNo. 2987。

表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种重排后的 cDNA 序列以及含有该 cDNA 序列的重组腺病毒,尤其涉及将编码猪肺炎支原体 P102 蛋白基因进行重排和优化后所得到的 cDNA 序列,本发明还涉及含有该 cDNA 序列的重组腺病毒以及它们在猪支原体肺炎的诊断、预防或治疗中的应用,属于猪支原体肺炎的防治领域。

背景技术

[0002] 猪肺炎支原体 (*Mycoplasma, hyopneumoniae*, Mhp) 是猪支原体肺炎 (MPS) 的主要病原体,该病又称猪地方流行性肺炎 (EPP),本病在我国流行范围广,对猪业造成了严重的危害。MPS 以接触性、高度传染性、慢性、高发病率和低死亡率为特点,主要表现为咳嗽、呼吸困难,解剖可见肺组织肉变或大理石样病变。其主要危害是引起猪的生长受阻和饲料转化率大幅下降。

[0003] 国内外多年的研究成果表明, Mhp 与猪呼吸道纤毛的特异性黏附是引起猪支原体肺炎发生的先决条件,而 Mhp 表面的黏着素(黏附因子)在 Mhp 致病中起关键作用。目前,已阐明的 Mhp 粘附因子共有 3 种,即 P97 (232 株)、Mhp1 (P5722 株) 和 J 株的一个分子量为 94kDa 的蛋白,其中研究最为深入的是 P97 蛋白。1995 年张启敬利用单克隆抗体 F2G5 抑制 Mhp 对猪呼吸道纤毛细胞的粘附作用,免疫印迹结果显示 F2G5 主要识别一个约 97kDa 的蛋白 (P97)。电子显微镜观察发现 F2G5 识别的蛋白质随机分布于 Mhp 的表面。这些结果显示 P97 的功能是作为 Mhp 的粘附因子。在 P97 下游有一段与之相邻的基因 P102。由于它与 P97 相邻,预测它也有细胞黏附或辅助 P97 的细胞黏附作用。

[0004] 在防治猪支原体肺炎中,发达国家试图通过建立无特定病原体猪群的猪场来预防猪支原体肺炎,但因耗资较大、管理困难等多方面的因素,未能取得良好的效果,特别是在发展中国家更显得不切合实际。在使用药物治疗该病时,存在治疗时间长、经济耗费大、效果不佳、药物残留以及食品安全等多种不利因素,即使临床治愈也可能长期带菌,给养猪业带来潜在的隐患。所以多数国家都倾向于使用疫苗来防治此病。70 年代以来,国外相继报道了使用灭活疫苗来预防本病,也取得了较好的效果。我国从 60 年代开始研制弱毒疫苗,目前已经有相应的产品问世,但国内生产的弱毒疫苗通过对仔猪进行肺脏接种来进行免疫,在实际应用过程中由于操作困难等原因很容易造成接种失败或异物性肺炎,限制了疫苗的应用。进口的灭活疫苗由于价格较贵、免疫效果不十分理想等原因应用并不太广泛。因此近年各国学者都在努力尝试研制包括猪肺炎支原体基因工程活载体疫苗和亚单位疫苗等新型疫苗用于猪肺炎支原体免疫。

[0005] 目前, Mhp 的防控主要采用药物治疗、免疫接种和种群净化,疫苗免疫主要应用灭活疫苗和弱毒疫苗,但由于各种因素使得灭活疫苗和弱毒疫苗的推广应用受到影响。因此,近年各国学者都在努力研制亚单位疫苗和活载体疫苗。以活病毒为载体的疫苗,可诱导机体产生针对目的抗原的免疫应答,是一种极具前景的新型疫苗形式。腺病毒具有粘膜感染的特点,用于制备重组病毒疫苗时,有利于刺激机体产生粘膜反应,从而保护机体免受通过

呼吸道粘膜途径入侵病原体的危害。研究表明,腺病毒作为疫苗载体在诱导粘膜免疫方面具有明显的优势,可模仿病毒天然的感染方式,并直接在体内表达天然的、保持完整生物活性的抗原蛋白,因此常常能诱导有效的特异性粘膜和体液免疫应答。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是将编码猪肺炎支原体 P102 蛋白基因进行重排和优化,得到一种重排后的编码猪肺炎支原体 P102 蛋白的 cDNA 序列;

[0007] 本发明目的之二是提供一种含有上述 cDNA 序列的表达载体;

[0008] 本发明目的之三是提供一种含有上述表达载体的宿主细胞;

[0009] 本发明的目的之四是提供一种含有上述 cDNA 序列的重组腺病毒;

[0010] 本发明的目的之五是提供一种由上述 cDNA 序列所编码的蛋白;

[0011] 本发明的目的之六是将所编码或表达的蛋白应用于猪支原体肺炎的诊断和防治;

[0012] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0013] 本发明首先利用体外诱变技术将猪肺炎支原体 P102 蛋白的阅读框架中的共 2700bp 个核苷酸中的 7 个 UGA 密码子诱变为 UGG,诱变后的核苷酸序列见序列 SEQ ID NO: 1 所示。

[0014] 含有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的表达载体以及含有该表达载体的宿主细胞也包括在本发明的保护范围之内;其中,所述的表达载体可以是穿梭载体或者是腺病毒表达载体等;

[0015] 本发明还提供了一种含有上述 SEQ ID NO:1 核苷酸序列的重组腺病毒,其微生物保藏号是 CGMCC No. 2987;保藏日期是:2009 年 3 月 26 日;分类命名是:腺病毒;保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所。

[0016] 本发明还提供了一种制备上述重组腺病毒的方法,包括:将 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列克隆到穿梭载体 pShuttle-CMV 上,得到重组穿梭载体;重组穿梭质粒经 Pme I 线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的 BJ5183 感受态细胞中,通过细菌内同源重组获得重组腺病毒;

[0017] 重组腺病毒经间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定,证明了该重组腺病毒成功的表达了 P102 蛋白,所表达的氨基酸序列为序列 SEQ ID NO:2 所示。将该重组病毒进行纯化并进行滴度测定,获得了高纯度、高滴度的表达 P102 基因的重组腺病毒。

[0018] 通过 RT-PCR、免疫荧光和 Western blot 检测证明 SEQ ID NO:1 序列在 293 细胞内获得表达。利用 TCID₅₀ 方法测得腺病毒滴度为 5×10^6 TCID₅₀/ml。利用重组腺病毒以肌注和滴鼻两种途径免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,重组病毒可诱导小鼠产生血清与肺匀浆液特异性 IgG,该重组腺病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和胞免疫应答,说明本发明重组腺病毒可制备成疫苗用于猪支原体肺炎的预防或治疗。

[0019] 本发明的详细描述:

[0020] 目的基因的突变:将猪肺炎支原体 P102 蛋白的阅读框架中 7 个 UGA 密码子进行突变。首先以支原体的基因组 DNA 为模板,设计三对特异性引物将全长 2700bp 的 P102 基因

分成三部分进行克隆 (A1、A2、B1、B2、C1、C2, 其中 A1、B1 位于突变位点处, A2 和 B1, B2 和 C1 存在互补序列), 回收扩增的三段特异性片段 (A、B、C) 酶切后连接到 pMD-18T 载体上。以该载体作为模板, 进一步通过 PCR 方法对 UGA 密码子进行替代, 最后利用互补序列使用多次 PCR 方法, 将三段 DNA 重新连接成一调完整序列。经序列测定后证实所扩增的特异性片段为所需的突变片段 (SEQ ID NO :1)。

[0021] 重组病毒的构建: 将该突变目的片断 (SEQ ID NO :1) 定向克隆到载体 pShuttle-CMV 载体中, 将鉴定正确的重组穿梭质粒经 Pme I 线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的 BJ5183 感受态细胞中, 通过细菌内同源重组获得重组腺病毒 DNA。纯化后的重组腺病毒质粒经 Pac I 酶切线性化后转染 AD293 细胞获得重组腺病毒。重组腺病毒经间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定, 证明了该重组腺病毒成功的表达了 P102 蛋白。重组腺病毒经肌注、滴鼻两种途径免疫小鼠均可以刺激小鼠产生 P102 的特异性血清 IgG 抗体。首免两周后即可检出, 三免十天抗体值达到高峰, 并且在三免后 18 天制备的肺匀浆液中, 也都可以检出特异性的 IgG 抗体。

[0022] 本发明利用腺病毒粘膜感染的特点, 采用非复制型腺病毒为载体, 构建了表达猪肺炎支原体 P102 基因的非复制型重组腺病毒。将突变成功的含有 5 个终止密码子猪肺炎支原体 P102 基克隆至腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV 中, pShuttle-CMV-P102 用内切酶 Pme I 线性化后电转化内含 pAdeasy-1 骨架载体的 BJ5183 感受态细胞, 通过细菌内的重组获得重组腺病毒 DNA, 将 Pac I 线性化的重组腺病毒 DNA 转染 AD293 细胞得到重组腺病毒。经过 RT-PCR、Western blot 及 IFA 检测证明 MhpP102 基因在 AD293 细胞内成功获得表达。

[0023] 为了研究重组腺病毒的免疫效果, 通过滴鼻和肌注两种不同的途径免疫小鼠。动物试验结果表明本发明重组病毒能够刺激小鼠产生针对 P102 蛋白的体液免疫反应, 从总体上看肌注与滴鼻产生的体液免疫反应水平较高, 肌注血清 IgG 抗体水平略高于滴鼻。并于三免后 18 天制备的肺匀浆液中, 也都可以检出特异性的 IgG 抗体。

[0024] 本发明采用的非复制型腺病毒 AdEasy 系统缺失了腺病毒基因组的 E1 和 E3 区, 这些片段的缺失可增强机体对外源抗原的免疫反应, 更好地刺激机体产生免疫保护作用。因此与复制型腺病毒相比, 非复制型腺病毒不仅更安全有效, 而且以低剂量的方式产生抗原蛋白而不裂解细胞, 故表达抗原的时间更持久, 有利于激发长期的免疫反应。重组腺病毒载体的稳定性好, 安全性高, 整合入染色体的概率小, 不存在演变为有害微生物的可能性。对动物无致癌性, 对人类致病性极低, 长期的应用实践表明, 该载体在用于人类的基因治疗方面和生态环境未造成不利影响, 所以本发明所构建的重组腺病毒具有广阔的应用前景。

附图说明

[0025] 图 1 第 1 轮片段 PCR 扩增结果 ;M :DNA 分子标准 2000 ;1 :上游引物 A1, 下游突变引物 a 2 PCR 扩增产物 ;

[0026] 图 2 第 1 轮片段 PCR 扩增结果 ;M :DNA 分子标准 2000 ;2 :下游引物 A2, 上游突变引物 a1PCR 扩增产物 ;

[0027] 图 3M :DNA 分子标准 2000 ;1 :上游引物 A1, 下游引物 A2PCR 扩增产物 ;

[0028] 图 4M :DNA 分子标准 2000 ;1 :A1、B2 为引物 PCR 扩增产物 ;

[0029] 图 5M :DNA 分子标准 15000 ;1 :A1、C3 为引物 PCR 扩增产物 ;

- [0030] 图 6P102 基因的 PCR 扩增 ;1 :P102C 基因 PCR 扩增产物 ;2 阴性对照 ;
- [0031] 图 7pshuttle-CMV-P102 的酶切鉴定 ;M :DL15000 DNA Marker ;1 :pShuttle-CMV 被 Not I+HindIII 酶切后的产物 ;2 :pShuttle-CMV-P102 被 Not I+HindIII 酶切后的产物 ;
- [0032] 图 8pShuttle-CMV-P102 的酶切鉴定 ;M : λ -Hind III DNAMarker ;1-2 :pAd-P102 被 Pac I 酶切后的产物 ;
- [0033] 图 9rAd-P102 的 RT-PCR 鉴定 ;M :DL2000 DNA Marker ;1 :AD293cells ;2 :RT-PCR 产物 ;
- [0034] 图 10 重组腺病毒 P102 蛋白表达的 Western Blot 分析 ;M :预先染色蛋白 Marker ;1 :rAd-P102 ;2 :AD293 细胞 ;
- [0035] 图 11 重组腺病毒 P102 蛋白表达的间接免疫荧光鉴定 ;A :AD293cells infected by rAd-P102 ;B :AD293 cells ;
- [0036] 图 12rAd-P102 免疫小鼠后的血清 IgG 的测定 ;
- [0037] 图 13 小鼠肺匀浆液 IgG 的测定 ;

具体实施方式

[0038] 以下通过实施来进一步描述本发明,应该理解的是,这些实施例仅用于例证的目的,决不限本发明的范围。

[0039] 实施例 1P102 基因的突变

[0040] 1.1 引物设计与 PCR 扩增

[0041] 引物 A1 5' 端引物设有 CCACC 序列, ATG 启动子, Hind III 位点, 3' 端引物设有 TAA 终止密码和 Xho I 位点。

[0042]

A1 :	ATGGATCCAAACCTTTTTGGTTAATAA	扩增 A 段基因引物
A2 :	CAGGTCGACATAATCAGAGAGGCTAAT	
a1 :	AAAAAATGGTCGGCAAAAACAGT	位点 241-243 突变引物
a2 :	CCGACCATTTTTTAAAATTATCTTTAATT	
a3 :	GCTCTTCAAGTCGTGAAAACCAATTAC	位点 610-612 突变引物
a4 :	TTCACGACTTGAAAGAGCTTTGGTTG	
a5 :	TCTAAAATTCTAAAATCCTGGCTTGAAA	位点 877-879 突变引物
a6 :	ATTTTAGAATTTTAGAAATTCCTGATTTG	
B1 :	CAGGAATTCTGGTATGGATCTCCGAATTCA	扩增 B 段基因引物
B2 :	CAGGTCGACAAAAGTGCTTACCTCTGTT	
C1 :	CAGGGATCCGAGAAGAAGCTAAG	扩增 C 段基因引物
C2 :	CCGGGTCGACTTACTTTTTAACATAGTTTC	

c1 :	ACAAGCATTGACAGCTTTTAATTTT	位点 1810-1812 突变引物
c2 :	GTCCAAATGCTGTCCCAAATTTTTC	
	P42A5e :gct aaa gaa acc ttt gaa att aca gtc aaa atc gt	位点 2161
	P42A6e :ttt caa agg ttt ctt tag ctc taa acc ttg atc ag	
c3 :	GAATGGTTTCATCTTGATTGGTATCA	位点 2521-2523 突变引物
c4 :	AGATGAAACCATTCTAAAGTAAAGAAAT	

[0043] 注：小写字母代表突变引物；大写字母代表扩增引物（A1 在引物设计时已将位点 33-36 突变成 TAA）

[0044] 1.2 两轮 PCR 均得到了预期大小的扩增片断（以 A 段第 76 个氨基酸为例将 TGA 突变成 TGG）

[0045] 第 1 轮 PCR 扩增出了 1 条约 720bp 和 1 条约 220bp 的条带，第 2 轮 PCR 扩增出了 1 条约 936bp 的条带，符合预期结果。（见图 1、图 2、图 3）

[0046] 1.3A+B 拼接后 PCR 扩增片断

[0047] 以突变成功的基因片断 A 和基因片断 B 为模板，A1、B2 为引物，扩增出 1 条约 1600bp 左右的条带，符合预期结果（图 4）。

[0048] 1.4A+B+C 拼接后 PCR 扩增完整 P102 基因片断

[0049] 以突变成功的基因片断 A+B 和 C 为模板，A1、C3 为引物，扩增出 1 条约 2670bp 左右的条带，符合预期结果，并送测序，证明 7 个 TGA 已全部突变成 TGG，突变成功（图 5），测序后的序列为 SEQ ID NO :1 所示。

[0050] 实施例 2 猪肺炎支原体 P102 基因重组腺病毒的构建及表达

[0051] 1 材料和方法

[0052] 1.1 菌株、质粒、细胞、基因片断

[0053] 猪肺炎支原体 Yin-1 株是本实验室于 2005 年由现地分离并鉴定的；P102 基因（实施例 1 所得到的突变序列 SEQ ID NO :1）；E. coli DH5 α 为 Novagen 公司产品；腺病毒表达载体系统 (AdEasy™ XL Adenoviral Vector System) 包括穿梭载体 pShuttle-CMV、电转化感受态细胞 BJ5183-AD-1、包装细胞 AD-293 和超级感受态细胞 XL-10 购自 Stratagene 公司。

[0054] 1.2 主要试剂

[0055] 组织 / 细胞 DNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均为上海华舜公司产品；蛋白质分子质量标准、限制性内切酶 NotI、HindIII 和 Pyrobest™ DNA 聚合酶为 Fermentas MBI 公司产品；限制性内切酶 Pme I、Pac I 为 NEB 公司产品；大量质粒提取试剂盒购自 Promega 公司；羊抗兔 IgG 酶标二抗为 Sigma 公司产品；FITC 标记山羊抗兔 IgG 为中山金桥公司产品；转染试剂 lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司；DNA 分子质量标准为宝生物工程（大连）有限公司产品；针对 P102 蛋白的多克隆抗体 P102C 由本实验室研制。

[0056] 1.3 引物设计与 PCR 扩增

[0057] 参照 Mhp 国际标准株 232 株的全基因序列,用 Primer 5.0 软件设计扩增 P102 基因的引物:预计扩增 2670bp 的片段。P1:5′-CAGGCGGCCGCATGTTACTTAAAAACCTTTT-3′;P2:5′-CGCGGAAGCTTTTAAACATAGTTTCTAATCAACC-3′;P1 下划线字母构成 Not I 酶切位点, P2 下划线构成 HindIII 酶切位点。以突变成功的 MhpP102 基因 (SEQ ID NO:1) 为模板,利用 Pyrobest™ DNA 聚合酶、P1 和 P2 扩增 P102 基因。PCR 反应条件为:95℃预变性 5min,94℃变性 45s,52℃退火 45s,72℃延伸 3min,35 个循环后,72℃延伸 10min。产物于 10g/L 琼脂糖凝胶电泳上电泳 30min(100V),回收目的片段。

[0058] 1.4 构建含 P102 基因的重组穿梭载体

[0059] 将上述 PCR 产物用胶回收试剂盒回收。回收产物用 Not I 和 HindIII 酶切与同样酶切的穿梭质粒 pShuttle-CMV 连接后,转化到 DH5 α 感受态细胞中。利用 Kan 抗性筛选重组质粒,并经 PCR、酶切鉴定重组质粒,获得阳性重组子 pShuttle-CMV-P102 并送上海生工公司测序。用 MegAlign 软件对测序结果与国际已知菌株的序列进行分析。

[0060] 1.5 重组腺病毒质粒 pAdCMV-P102 的构建

[0061] 将穿梭质粒 pShuttle-CMV-P102 用 Pme I 限制性内切酶完全酶切线性化,经胶回收试剂盒回收,无菌双蒸水溶解,使质粒浓度为 200ng/ μ L 左右。取 5 μ L 的线性化的 pShuttle-CMV-P102 电转化到含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞中,于含 50 μ g/mL Kan 抗性 LB 平板上培养 16-18 个小时。挑取单菌落,提质粒,分别用 PCR 和 Pac I 酶切鉴定。

[0062] 1.6 重组腺病毒 pAdCMV-P102 在 AD293 细胞中的包装

[0063] 将鉴定正确的重组腺病毒 DNA 转入 DH5 α 感受态细胞中,挑取单克隆扩大培养,提取质粒,经 Pac I 酶切后酚氯仿抽提并用乙醇沉淀,用 lipofectamine™2000 将 Pac I 线性化的重组腺病毒 DNA 转染 AD293 细胞,待出现明显病变后收集细胞,在 -80℃/37℃反复冻融裂解细胞 3 次后,收取上清即为病毒原液,用病毒原液可再次感染细胞用于病毒传代。

[0064] 1.7 重组腺病毒 pAdCMV-P102 的鉴定

[0065] 1.7.1 RT-PCR 鉴定

[0066] 1.7.1.1 RT-PCR 引物设计

[0067] 参照 Mhp 国际标准株 232 株的全基因序列,用 Primer 5.0 软件设计扩增包含部分 P102 基因的 RT-PCR 引物。P3:5′-CAGGAATTCTGGTATGGATCTCCGAATTCA-3′;P4:5′-CAGGTCCGACAAAAGTGCTTACCTTGACTGTT-3′,预计扩增片断 699bp。

[0068] 1.7.1.2 RT-PCR

[0069] 用总 RNA 提取试剂盒分别提取病变细胞和正常 293 细胞的总 RNA。反转录:取上述 RNA 模板 13.5 μ L,加入 1 μ L 随机引物,70℃作用 10min 后,立即冰浴 3min,然后加入 Rnasin(40U/ μ L)0.5 μ L, M-MLV ReactionBuffer 5 μ L, dNTPs(2.5mM)4 μ L, 灭菌超纯水 1 μ L, M-MLV RT(200U/ μ L)1 μ L, 42℃水浴 1h。以 P3、P4 为引物进行 PCR 扩增:上下游引物(5 μ M)各 1.2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTP1.6 μ L, MgCl₂ 1.2 μ L, rTaq 酶 1 μ L, 灭菌超纯水 10.8 μ L, cDNA 模板 1 μ L。扩增结束后用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0070] 1.7.2 重组腺病毒 pAdCMV-P102 的 Western blot 鉴定

[0071] 用 Western 及 IP 细胞裂解液裂解重组型病毒 pAdCMV-P102 感染产生病变的 AD293 细胞,提取细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,转 NC 膜。加入 1:50 倍稀释的一抗

Ag_{P102C} 37℃反应 1h。羊抗兔 IgG 酶标二抗 (1 : 3000 稀释) 37℃反应 1h。用 DAB 化学发光法显色。

[0072] 1.7.3 重组腺病毒 pAdCMV-P102 的免疫荧光鉴定

[0073] 在 96 孔板中铺 AD293, 长满后接重组腺病毒 pAdCMV-P102。待出现明显病变弃培养液后用预冷的甲醇 / 丙酮 (1 : 1) 室温固定 15min, 吸弃固定液, PBS 洗三次, 每次 10min, 干燥。在孔中加入 1 : 50 稀释的一抗 Ag_{P102C} 温盒内 37℃作用 1h。PBS 洗三次后加入 1 : 100 稀释的 FITC 标记山羊抗兔 IgG 为二抗 37℃避光作用 1h。在荧光倒置显微镜下观察。

[0074] 1.8 重组腺病毒的滴度测定

[0075] 将浓缩的病毒进行倍比稀释, 用 TCID₅₀ 的方法测定其滴度。将重组病毒作 10⁻² ~ 10⁻¹¹ 系列稀释, 分别接种于已单层的 AD293 细胞 96 孔板, 每个稀释度 4 个孔, 100 μL / 孔, 同时设不加病毒的正常细胞对照, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养, 连续观察记录病变细胞 7d。按照 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

[0076] 1.9 动物实验

[0077] 以肌注和滴鼻两种途径免疫 6 ~ 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 每组 5 只, 剂量均为 5 × 10⁶TCID₅₀ / 只, 以接种 PBS 组为对照, 每隔 15d 免疫 1 次, 共免疫 3 次。分别在首免前和每次免疫前采血, 分离血清。八周后小鼠处死后取肺制匀浆液, 以 pET-28a 为载体表达的 P102C 末端蛋白 (P102C-28a) 为抗原, 以鼠血清和肺匀浆液为一抗, 以羊抗小鼠 IgG 为二抗进行间接 ELISA。

[0078] 2 实验结果

[0079] 2.1 P102 基因的扩增

[0080] 以突变完成的 P102 基因为模板, 用 P1, P2 扩增 P102 基因, 10g/L 琼脂糖凝胶电泳结果得到 2670bp 左右的条带, 与预期的目的片段大小相符 (图 6)。

[0081] 2.2 穿梭载体 pShuttle-CMV-102 的鉴定

[0082] 将扩增片断插入到 pShuttle-CMV 穿梭载体中, 经 Not I + HindIII 酶切, 从候选重组穿梭质粒中切出一个 2670bp 大小的 DNA 片段。序列测定结果表明 P102 基因插入的位置、大小和读码框架均正确, 获得重组穿梭载体。(图 7)

[0083] 2.3 重组腺病毒 pAdCMV-P102 的获得与酶切鉴定

[0084] 将 pShuttle-CMV-P102 用内切酶 Pme I 线性化后电转化内含 pAdeasy-1 骨架载体的 BJ5183 感受态细胞, pShuttle-CMV-P102 与 pAdeasy-1 在 BJ5183 内发生同源重组, 用 Pac I 酶切鉴定后在电泳图上显示为一条大小为 4.5kb 的小片断和 1 条大小约 30kb 的大片段 (图 8)。鉴定为阳性的腺病毒基因组质粒, Pac I 线性化后, 通过脂质体转染 AD293 细胞, 7-10 天后细胞出现肿胀、园缩等典型的细胞病变, 待 14 天后细胞完全病变脱壁。收获所有细胞反复冻融后取上清得到重组腺病毒原液, 将原液感染 293 细胞产生病变。

[0085] 2.4 pAdCMV-P102 表达 MhpP102 的 RT-PCR 鉴定

[0086] 提取重组腺病毒总 RNA, 用包含部分 P102 基因的上下游引物 P3, P4 进行 PCR, 扩增出与预期相符的 699bp 特异性片断 (图 9)。

[0087] 2.5 pAdCMV-P102 表达 MhpP102 的 Western blot 鉴定

[0088] 将重组病毒接种 AD293 细胞, 收取病变后的细胞进行 SDS-PAGE、转膜, 并进行 Western blot 分析, 该重组病毒能在 AD293 细胞中表达大小约为 102kDa 的 P102 蛋白 (图

10)。

[0089] 2. 6pAdCMV-P102 表达 MhpP102 的免疫荧光鉴定

[0090] 将重组病毒接种长满 AD293 细胞的 96 孔板进行间接免疫荧光试验,可以发现该重组病毒可以在细胞中表达 P102 蛋白(图 11)。

[0091] 2. 7 重组腺病毒的纯化及、滴度测定

[0092] 将腺病毒第 5 代细胞培养物进行系列稀释,接种 AD293 细胞,连续观察 7d,通过 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀,可以得到滴度为 10⁶TCID₅₀/ml 的腺病毒。

[0093] 2. 8 重组腺病毒免疫小鼠可产生特异性的 IgG 抗体

[0094] 重组腺病毒经肌注、滴鼻两种途径免疫小鼠均可以刺激小鼠产生 P102 的特异性血清 IgG 抗体。首免两周后即可检出,三免十天抗体值达到高峰(图 12),并且在三免后 18 天制备的肺匀浆液中,也都可以检出特异性的 IgG 抗体(图 13)。

[0095] 序列表

[0096] <110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

[0097] <120> 表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用

[0098] <130>KLPI090287

[0099] <160>2

[0100] <170>PatentIn version 3.1

[0101] <210>1

[0102] <211>2697

[0103] <212>DNA

[0104] <213>artificial sequence

[0105] <400>1

[0106]	atgttactta aaaaaccttt ttggttaata acaacaattg ccggaattag tcttagttta	60
[0107]	tcagccgctg ttggtacagt tgctcggaatt aattcttata ataaatcata ttattcttat	120
[0108]	ctaaatgaaa atccaagtca gctaaaagta gcaaaaaatg ctaaaattag tcaggaaaaa	180
[0109]	tttgattcaa ttgttttaaa tcttaagatt aaagataatt ttaaaaaatg gtcggcaaaa	240
[0110]	acagttttaa ctgctgccaa aagegatctt tategttata atcttgtttc tgcttttgat	300
[0111]	ctaagccaac taataaaca tgattattca gttagttttg atcttgaaaa tgcagtagtt	360
[0112]	gatcaaaatt cgattaaaaa tgttattatt tatgcaaaat ctgataagga tcaaataact	420
[0113]	tattcaaac aaattgtact taaaggcttt ggaaatacag aacaagctag aactaatfff	480
[0114]	gatttttagcc aaattgattc gagcaagtct tttgttgatc tttcaagggc aaatctaact	540
[0115]	ttgatggaat tccaaatfff acttgcccaa aatfffgaaa atgaaagagg aagtaattgg	600
[0116]	ttttcacgac ttgaaagagc tttggttgca tcaaaagcga gtctttcact ttataattcc	660
[0117]	ttaggagaac ccgtatfff aggcccagat tatcaattag acccagtttt ggatcgaaaa	720
[0118]	aaattattaa ctttgetaaa taaagatgga aaattagctc ttggacttaa tttagtgcaa	780
[0119]	atttcaacta aaaaaactat gaatftaaat cttgaagttc gcggcgatg ttcaaatcag	840
[0120]	gaaatftcta aaattctaaa atcctggctt gaaacaaatc ttcaaggcaa attaaaaacc	900
[0121]	aaagatgatt tgcaaatggc actagtaaaa gataaaatta gcctctctga ttattggtat	960
[0122]	ggatctccga attcaaaagt aaatacatcc caaatfttaa caaaaagtaa aggattftaaa	1020

[0162]	Lys Val Ala Lys Asn Ala Lys Ile Ser Gln Glu Lys Phe Asp Ser Ile
[0163]	50 55 60
[0164]	Val Leu Asn Leu Lys Ile Lys Asp Asn Phe Lys Lys Trp Ser Ala Lys
[0165]	65 70 75 80
[0166]	Thr Val Leu Thr Ala Ala Lys Ser Asp Leu Tyr Arg Tyr Asn Leu Val
[0167]	85 90 95
[0168]	Ser Ala Phe Asp Leu Ser Gln Leu Ile Asn Asn Asp Tyr Ser Val Ser
[0169]	100 105 110
[0170]	Phe Asp Leu Glu Asn Ala Val Val Asp Gln Asn Ser Ile Lys Asn Val
[0171]	115 120 125
[0172]	Ile Ile Tyr Ala Lys Ser Asp Lys Asp Gln Ile Thr Tyr Ser Lys Gln
[0173]	130 135 140
[0174]	Ile Val Leu Lys Gly Phe Gly Asn Thr Glu Gln Ala Arg Thr Asn Phe
[0175]	145 150 155 160
[0176]	Asp Phe Ser Gln Ile Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Asp Leu Ser Arg
[0177]	165 170 175
[0178]	Ala Asn Leu Thr Leu Met Glu Phe Gln Ile Leu Leu Ala Gln Asn Phe
[0179]	180 185 190
[0180]	Glu Asn Glu Arg Gly Ser Asn Trp Phe Ser Arg Leu Glu Arg Ala Leu
[0181]	195 200 205
[0182]	Val Ala Ser Lys Ala Ser Leu Ser Leu Tyr Asn Ser Leu Gly Glu Pro
[0183]	210 215 220
[0184]	Val Phe Leu Gly Pro Asp Tyr Gln Leu Asp Pro Val Leu Asp Arg Lys
[0185]	225 230 235 240
[0186]	Lys Leu Leu Thr Leu Leu Asn Lys Asp Gly Lys Leu Ala Leu Gly Leu
[0187]	245 250 255
[0188]	Asn Leu Val Gln Ile Ser Thr Lys Lys Thr Met Asn Leu Asn Leu Glu
[0189]	260 265 270
[0190]	Val Arg Gly Ala Ile Ser Asn Gln Glu Ile Ser Lys Ile Leu Lys Ser
[0191]	275 280 285
[0192]	Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gln Gly Lys Leu Lys Thr Lys Asp Asp Leu
[0193]	290 295 300
[0194]	Gln Met Ala Leu Val Lys Asp Lys Ile Ser Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr
[0195]	305 310 315 320
[0196]	Gly Ser Pro Asn Ser Lys Val Asn Thr Ser Gln Ile Leu Thr Lys Ser
[0197]	325 330 335
[0198]	Lys Gly Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Arg Glu Ser Asn Phe Phe Leu
[0199]	340 345 350
[0200]	Asn Thr Lys Ile Gly Thr Val Tyr Leu Ser Ile Ile Pro Lys Leu Leu

[0201]	355	360	365
[0202]	Asp Pro Ser Gln Ile Ser Val Val Asp Lys Lys Lys Leu Val Glu Asn		
[0203]	370	375	380
[0204]	Gln Lys Ile Arg Phe Glu Ile Thr Ala Ser Leu Lys Arg Lys Ala Ile		
[0205]	385	390	395
[0206]	Asp Lys Lys Phe Ile Ile Gln Asp Leu Pro Val Phe Val Asp Leu Lys		
[0207]	405	410	415
[0208]	Val Asp Phe Asn Lys Tyr Gln Ala Ala Val Ala Gln Met Phe Gly Thr		
[0209]	420	425	430
[0210]	Ile Lys Ser Val Lys Glu Phe Ser Met Pro Glu Asp Gln Asp Ala Lys		
[0211]	435	440	445
[0212]	Thr Leu Ser Ser Asn Glu Ile Lys Gln Arg Val Asp Arg Leu Phe Glu		
[0213]	450	455	460
[0214]	Leu Ala Lys Thr Val Thr Asn Leu Glu Asn Pro Ser Glu Glu Val Leu		
[0215]	465	470	475
[0216]	Lys Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Thr Gly Lys Tyr Leu Val Asp Gln Asp		
[0217]	485	490	495
[0218]	Gln Glu Lys Val Lys Gln Glu Leu Lys Thr Val Ile Glu Gly Leu Lys		
[0219]	500	505	510
[0220]	Ser Lys Ala Asn Thr Gln Lys Thr Glu Lys Asn Ser Pro Thr Gln Pro		
[0221]	515	520	525
[0222]	Lys Lys Pro Glu Val Ser Leu Ala Lys Thr Thr Glu Asn Ser Ala Lys		
[0223]	530	535	540
[0224]	Thr Val Lys Gly Ser Thr Phe Ala Glu Glu Ala Lys Gly Gln Ser Gln		
[0225]	545	550	555
[0226]	Ser Gln Gln Thr Arg Ala Val Ser Thr Ser Ser Pro Gln Thr Ser Gln		
[0227]	565	570	575
[0228]	Asn Leu Asn Ser Asn Ser Thr Thr Ser Thr Asn Leu Ala Leu Glu Asn		
[0229]	580	585	590
[0230]	Glu Lys Phe Gly Thr Ser Ile Trp Thr Ala Phe Asn Phe Ala Asn Ile		
[0231]	595	600	605
[0232]	Tyr Asn Leu Glu Asn Thr Lys Ser Glu Tyr Glu Ile Ser Thr Leu Gly		
[0233]	610	615	620
[0234]	Asn Lys Leu Phe Phe Asp Phe Lys Leu Val Asp Lys Thr Asn Gln Asn		
[0235]	625	630	635
[0236]	Leu Ile Leu Ala Gln Ser Lys Ile Ser Leu Asn Asn Ile Ile Asn Ser		
[0237]	645	650	655
[0238]	Asn Lys Ser Ala Tyr Asp Ile Ile Lys Lys Phe Asn Pro Asp Val Phe		
[0239]	660	665	670

[0240]	Leu Asp Gly Thr Ile Asn Tyr Gln Asp Gln Gly Arg Asp Lys Lys Glu
[0241]	675 680 685
[0242]	Phe Ile Leu Lys Asp Leu Ser Asp Asn Lys Leu Ile Phe Lys Ser Glu
[0243]	690 695 700
[0244]	Asp Ala Ile Gln Thr Asp Gln Gly Leu Glu Leu Lys Lys Pro Leu Lys
[0245]	705 710 715 720
[0246]	Leu Gln Ser Lys Ser Ser Asn Pro Glu Lys Glu Ile Ser Thr Ser Leu
[0247]	725 730 735
[0248]	Tyr Thr Gly Ala Ile Tyr Leu Val Phe Asp Ala Lys Asn Thr Ser Asp
[0249]	740 745 750
[0250]	Gly Asn Trp Ile Asn Leu Leu Ala Asp Arg Lys Gly Lys Gly Leu Val
[0251]	755 760 765
[0252]	Ile Lys Val Lys Ser Ser Asp Asn Asn Ile Pro Ile Thr Lys Glu Ile
[0253]	770 775 780
[0254]	Val Glu Asn Gly Thr Tyr Leu Tyr Glu Ile Leu Ala Gly Lys Asp Ser
[0255]	785 790 795 800
[0256]	Ile Lys Val Asn Ser Tyr Phe Phe Pro Thr Lys Tyr Pro Lys Arg Val
[0257]	805 810 815
[0258]	Lys Arg Leu Asn Phe Lys Ile Asn Pro Lys Asp Thr Leu Pro Asn Phe
[0259]	820 825 830
[0260]	Phe Thr Leu Glu Trp Phe His Leu Asp Trp Tyr Gln Ile Gly Pro Gly
[0261]	835 840 845
[0262]	Glu Gln Asn Lys Lys Pro Gln Gln Asn Ala Lys Lys Glu Pro Thr Ile
[0263]	850 855 860
[0264]	Ile Leu Lys Thr Leu Ala Ile Phe Asn Asp Lys Ser Phe Ala Glu Lys
[0265]	865 870 875 880
[0266]	Gly Ser Leu Thr Lys Arg Ser Glu Leu Ile Asn Gly Leu Ile Arg Asn
[0267]	885 890 895
[0268]	Tyr Val

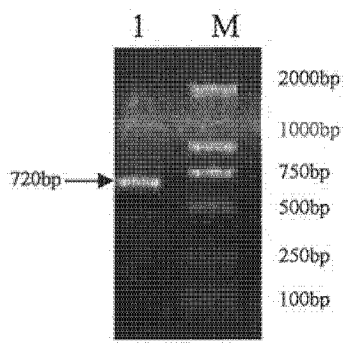


图 1

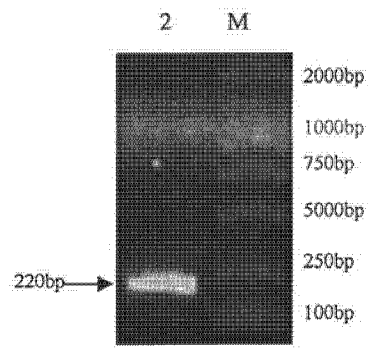


图 2

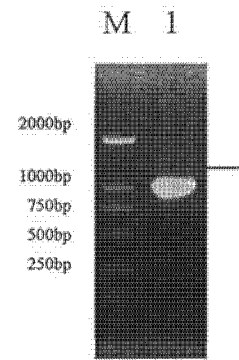


图 3

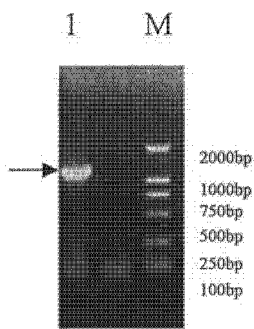


图 4

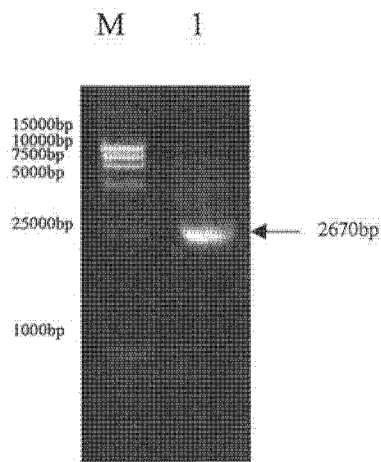


图 5

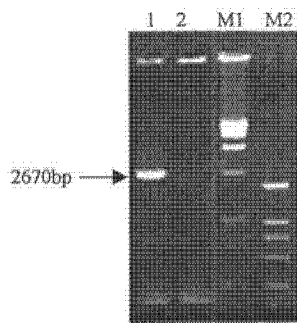


图 6

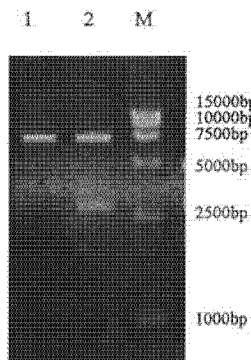


图 7

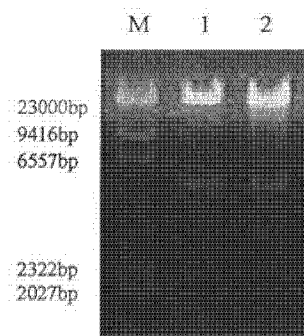


图 8

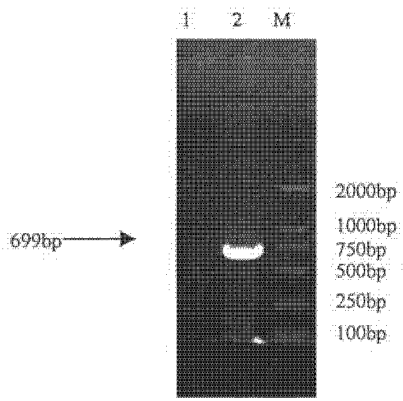


图 9

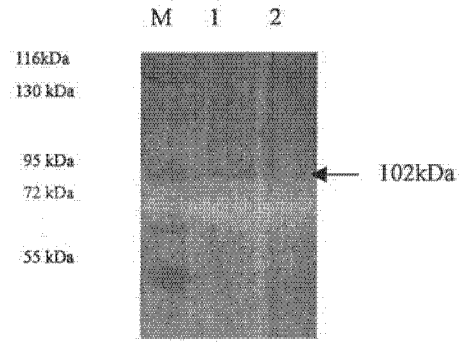


图 10

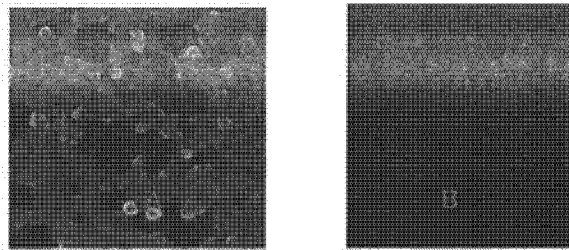


图 11

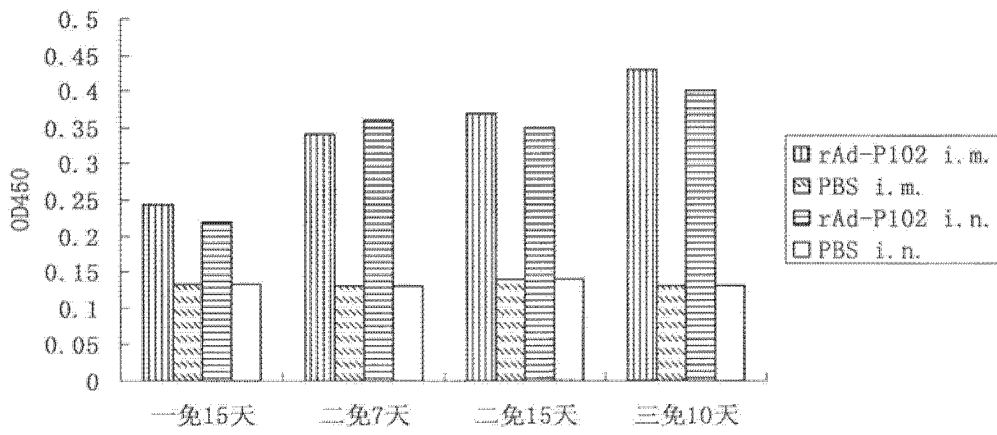


图 12

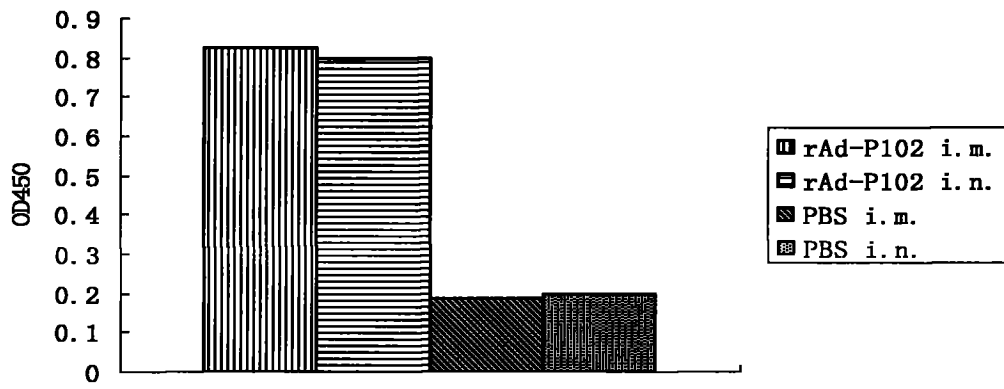


图 13

专利名称(译)	表达猪肺炎支原体P102蛋白的重组腺病毒及其应用		
公开(公告)号	CN101659954B	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	CN200910160070.2	申请日	2009-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	辛九庆 李媛 郭丹 郭军 陈超 曹培丽 张美晶 董惠 姜海芳		
发明人	辛九庆 李媛 郭丹 郭军 陈超 曹培丽 张美晶 董惠 姜海芳		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/63 C12N7/01 C07K14/30 C12N15/70 C12Q1/68 G01N33/53 A61K48/00 A61K39/02 A61P11/00 A61P31/04 C12Q1/70 C12R1/93 C12R1/19 C12R1/35		
代理人(译)	孙皓晨		
审查员(译)	丁海		
其他公开文献	CN101659954A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了表达猪肺炎支原体P102蛋白的重组腺病毒及其应用。本发明首先将猪肺炎支原体P102蛋白的基因进行突变，将突变后的全基因(SEQ ID NO : 1)克隆到穿梭载体pShuttle-CMV上，得到重组穿梭载体；经线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的感受态细胞中，通过细菌内同源重组获得重组腺病毒。重组腺病毒经间接免疫荧光和Western Blot鉴定证明该重组腺病毒成功表达了P102蛋白。将本发明重组腺病毒以肌注和滴鼻两种途径免疫6~8周龄雌性Balb/c小鼠，重组病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和胞免疫应答，表明本发明重组腺病毒可应用于猪支原体肺炎的诊断、预防或治疗。

